

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 06-078759

(43)Date of publication of application : 22.03.1994

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

(21)Application number : 05-140227

(71)Applicant : BEHRINGWERKE AG

(22)Date of filing : 11.06.1993

(72)Inventor : BOSSLET KLAUS DR

(30)Priority

Priority number : 92 4219250 Priority date : 12.06.1992 Priority country : DE

(54) SERUM-FREE CELL CULTURE MEDIUM

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a nutrient medium for cell culture containing amino acids, vitamins, cofactors and inorganic salts, and free from an animal protein.

CONSTITUTION: This nutrient medium for cell culture contains amino acids, vitamins, cofactors and inorganic salts, and further human transferrin, human insulin, ethanolamine and sodium selenite.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The nutrition culture medium for cell cultures containing the amino acid characterized by containing further Homo sapiens transferrin, human insulin, ethanolamine, and a sodium selenite, a vitamin, cofactor, and the usual mineral salt.

[Claim 2] The nutrition culture medium according to claim 1 whose use basal medium is DMEM/F12 (1:1) culture medium, DMEM (Dulbecco denaturation Eagle's medium), the William culture medium E, or hum F12 culture medium.

[Claim 3] The pyruvic-acid sodium concentration in a culture medium is the nutrition culture medium according to claim 1 by which a use basal medium is RPMI 1640 culture medium, CMRL 1066 culture medium, a BME basal medium, a way mouse culture medium, NCTC 135 culture medium, or MEM (minimum essential medium), and pyruvic-acid sodium is added in 25-500, and an amount that becomes in l. and 110mg /preferably.

[Claim 4] The component of the following [ inside / of 200l. of liquids ] (gram unit): Basal-medium component NaCl 1280. 00 KCl 80.00 MgSO4.7H2O 40.00 NaH2PO4andH2O 25.00 CaCl2.2H2O 52.80 Fe(NO3) 3.9H2O 0.02 Phenol Red 3.70 A glucose andH2O 990.00 Pyruvic-acid sodium 22.10 L-alanine 7.14 L-arginine HCl 16.80 L-asparagine andH2O 13.66 L-asparatic acid 10.63 L-cysteine 9.60 L-glutamic acid 11.83 Glycine 6.02 L-histidine HCl-H2O 8.40 L-isoleucine 21.00 L-leucine 21.00 L-lysine HCl 29.20 L-methionine 6.00 L-phenylalanine 13.20 L-proline 9.22 L-serine 8.42 L-threonine 19.00 L-tryptophan 3.20 L-thyrosin 14.40 L-valine 18.80 Calcium pantothenate 0.80 Choline chloride 0.80 Folic acid 0.80 I-inositol 1.44 Nicotinamide 0.80 Pyridoxal HCl 0.80 Riboflavin 0.08 Thiamine HCl0.80 NaHCO3 750.00 additional component Human insulin (Hoechst:PHFM) 2.00 Homo sapiens transferrin (Behringwerke AG) Product identifier : phiTRE 7.00 Ethanolamine 1.68ml 9.4 ml sodium selenite (1mM) Distilled water 200l. of ad(s) is contained. And it is the nutrition culture medium according to claim 1 by which L-glutamine is added before use in an amount from which 140-1200mg /becomes the concentration of 600mg/l. preferably l.

[Claim 5] Operation of the nutrition culture medium according to claim 1 for a hybridoma, transformer FEKUTOMA, or tumor cell network growth.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001] Although this invention includes amino acid, a vitamin, cofactor, and mineral salt, it relates to the nutrition culture medium for cell proliferations which does not contain animal protein.

[0002] It depends for the production of present age physic based on biotechnology on an eukaryotic cell culture production system complicated in many cases. It is because many glycoproteins cannot be functionally produced in an activity form in a simple procaryote. These complicated eukaryotic cell culture systems require the nutrition culture medium containing the mixture of the amount protein of macromolecules, or a lipid, especially the fetal calf serum (FBS) of cost quantity other than the specified salt, a vitamin, cofactor, and amino acid (basal medium). The amount component of these macromolecules which does not become not much clear although required of the number of nutrition culture-medium Nakata and high concentration, and carries out origin to fetal calf serum must be separated from the chemical which should be produced by the purification approach elaborate by which after a fermenter production phase. Furthermore, it is required to guarantee that Use FBS does not contain the pathogen matter.

[0003] It will be desirable if there is a low cost nutrition culture medium which enables growth of the far-reaching eukaryotic cell network exactly like the FBS content nutrition culture medium of cost quantity, and does not contain animal different protein.

[0004] It found out that the nutrition culture medium of the specified appropriate price which enables permanent growth of many eukaryotic cell networks to the same extent with a FBS content nutrition culture medium was producible to a surprising thing. Although it does not contain animal protein, the Homo sapiens transferrin, the human insulin, the ethanolamine, and the sodium selenite other than amino acid, a vitamin, cofactor, and the usual mineral salt are contained.

[0005] This invention relates to the nutrition culture medium for cell cultures containing the amino acid characterized by containing Homo sapiens transferrin, human insulin, ethanolamine, and a sodium selenite, a vitamin, cofactor, and the usual mineral salt.

[0006] It is desirable to use the transferrin and the insulin which are approved clinically.

[0007] The culture medium known in the conventional technique as a culture medium (basal medium) including amino acid, a vitamin, cofactor, and mineral salt can be used.

[0008] This type of basal media are an MEM alpha culture medium, DMEM/F12 (1:1) culture medium, DMEM (Dulbecco denaturation Eagle's medium), the William (William) culture medium E, hum (Ham) F12 culture medium, etc.

[0009] pyruvic-acid sodium -- 25-500 -- if it adds by the concentration of 110mg/l. preferably, other basal media can be used. The example of these basal media is :RPMI 1640 culture medium which is as follows, CMRL 1066 culture medium, a BME basal medium, a way mouse (Waymouth) culture medium, NCTC 135 culture medium, and MEM (minimum essential medium).

[0010] an insulin and transferrin -- either of these basal media -- the concentration in the culture medium -- an insulin -- 6-20 -- desirable -- 8-12mg [ l. ] /and transferrin -- 20-50 -- it is added so that it may reach [ l. ] in 30-40mg /preferably.

[0011] ethanolamine and a sodium selenite -- a basal medium -- the concentration in the culture medium -- ethanolamine -- 1.3-20 -- desirable -- 8-14mg [ l. ] /and a sodium selenite -- 2-20 -- it is added so that it may reach [ l. ] in 6-10microg /preferably.

[0012] L-glutamine is added by the culture medium before use so that 140-1200mg /of concentration of this amino acid may become in l. and 600mg /preferably l.

[0013]  
[Example] The culture medium which has the following presentations was prepared. The shown amount (gram unit) is related with 200l. of culture media.

[0014]  
Basal-medium component NaCl 1280. 00 KCl 80.00 MgSO4.7H2O 40.00 NaH2PO4andH2O 25.00 CaCl2.2H2O 52.80 Fe(NO3) 3.9H2O 0.02 Phenol Red 3.70 A glucose andH2O 990.00 Pyruvic-acid sodium 22.10 L-alanine 7.14 L-arginine HCl 16.80 L-asparagine andH2O 13.66 L-asparatic acid 10.63 L-cysteine 9.60 L-glutamic acid 11.83 Glycine 6.02 L-histidine HCl-H2O 8.40 L-isoleucine 21.00 L-leucine 21.00 L-lysine HCl 29.20 L-methionine 6.00 L-phenylalanine 13.20 L-proline 9.22 L-serine 8.42 L-threonine 19.00 L-tryptophan 3.20 L-thyrosin 14.40 L-valine 18.80 Calcium pantothenate 0.80 Choline chloride 0.80 Folic acid 0.80 I-inositol 1.44 Nicotinamide 0.80 Pyridoxal HCl 0.80 Riboflavin 0.08 Thiamine HCl 0.80 NaHCO3750.00 additional component Human insulin (Hoechst:PHFM) 2.00 Homo sapiens transferrin (Behringwerke AG, product identifier:phiTRE) 7.00 Ethanolamine 1.68ml Sodium selenite (1mM) 9.4ml Distilled water 200l. [0015] of ad(s) 600mg/l. In order to compare a hybridoma and transformer FEKUTOMA with this culture medium and it, it was made to increase by the FBS content basal medium (Dulbecco culture-medium +FBS) after adding a glutamine. A result is shown in Table 1. Under the standard cell culture condition, the cell was shown to Table 1 in a steamy saturation ambient atmosphere by 37 degrees C and 5%CO2, and period culture was carried out and it measured a viable count and product concentration about the aliquot.

[0016] It is proved that these data have a DKHI culture medium equivalent to a D-FBS perfect medium about cell proliferation and productive efficiency. Both the culture media of a proliferation rate are the same.

[0017] Furthermore, Homo sapiens and a rat tumor cell network were also able to be cultivated by the culture medium (Table 2). The culture medium for a comparison was made into the ITES culture medium released by DMEM+10%FBS, Murakami, etc. (Proc.natl.Acad.Sci.USA 79, 1158-1162, 1982).

[0018] A DKHI culture medium is 10mg/l. An insulin and 200micro mol/l. Ethanolamine, 1 mmol/liter It differs from an ITES culture medium at the point which contains a pyruvic acid and 3.75g [/l. ] sodium hydrogencarbonate, and does not contain the HEPES buffer solution (see Table 3 for a comparison). The improvement in cell proliferation is brought about as these differences are shown in Table 2.

[0019]  
[Table 1]

細胞系統	細胞数 x 105/ml xxx					生産効率	
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	(5日目、ngタンパク質/ml)	
トランスフェクターマ							
BHK系	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A	/ B
B 70/6	2/2	2/2	4/4	8/8	8/8	1000-2000/	500-2000 x
B 52/44	3/3	3/3	6/6	10/10	10/10	1000-2500/	1000-2000 x
B 101/8	2/2	2/2	4/4	8/8	8/8	2000-3000/	2500-4000 x
ハイブリドーマ							
SP-2系							
835/6	2/2	3/3	6/6	12/12	12/12	12000/30000	xx
2128/65	2/2	3/3	6/6	12/12	12/12	10000/2000	xx
NSO系							
2064/34	2/2	3/3	6/6	10/10	10/10	20000/20000	xx
2093/1072	2/2	3/3	6/6	11/11	11/11	20000/25000	xx

x : ヒト I g G  
x x : マウス I g G  
x x x : 顕微鏡計数箱で測定  
A : D-FBS-培地  
B : DKHI-培地



[0020]  
[Table 2]

	DKHI	DMEM+10%FBS	ITES
乳癌(ヒト): T-47	増殖	増殖	増殖なし
メラノーマ(ヒト): M-21	増殖	増殖	増殖なし
膵癌(ヒト): PaTu 8902	増殖	増殖	増殖なし
MiaPaCa2	増殖	増殖	増殖なし
結腸癌(ヒト): LOVO	増殖	増殖	増殖なし
LS-174-T	増殖	増殖	増殖なし
胃癌(ヒト): Mz-Sto-1	増殖	増殖	増殖なし
乳腺癌(ラット): Rc3230Ac	増殖	増殖	増殖なし
マクロファージ(ヒト): U-937	増殖	増殖	増殖なし

[0021]  
[Table 3]

I T E S 培地およびD K H I 培地における添加成分の比較

	I T E S	D K H I	
基礎培地	DMEM/F12(1 : 1)	DMEM	
HEPES	15mM	—	*
NaHCO <sub>3</sub>	1.2 g / ℓ	3.75 g / ℓ	*
インスリン	5mg / ℓ	10mg / ℓ	*
トランスフェリン	35mg / ℓ	35mg / ℓ	
亜セレン酸ナトリウム	2.5nM-2.5mM	50nM	
エタノールアミン	20μM	200μM	*
ピルビン酸ナトリウム	—	1mM	*
レーグルタミン	—	2mM	*

\* I T E S 培地およびD K H I 培地の間の有意差

[0022] As mentioned above, although this invention was explained to the detail, this invention can summarize and show this according to the following embodiment further.

1) The nutrition culture medium for cell cultures containing the amino acid characterized by containing further Homo sapiens transferrin, human insulin, ethanolamine, and a sodium selenite, a vitamin, cofactor, and the usual mineral salt.

2) The nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication containing the transferrin and the insulin which were approved clinically.

3) The nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication whose use basal medium is DMEM/F12 (1:1) culture medium, DMEM (Dulbecco denaturation Eagle's medium), the William culture medium E, or hum F12 culture medium.

4) The pyruvic-acid sodium concentration in a culture medium is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which a use basal medium is RPMI 1640 culture medium, CMRL 1066 culture medium, a BME basal medium, a way mouse culture medium, NCTC 135 culture medium, or MEM (minimum essential medium), and pyruvic-acid sodium is added in 25-500, and an amount that becomes in l. and 110mg /preferably.

[0023] 5) For the insulin concentration in a culture medium, an insulin is the nutrition culture medium of the

preceding clause 1 publication by which it is added in 6-20, and an amount that becomes in l. and 8-12mg /preferably.

6) For the transferrin concentration in a culture medium, transferrin is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 20-50, and an amount that becomes in l. and 30-40mg /preferably.

7) For the ethanolamine concentration in a culture medium, ethanolamine is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 1.3-20, and an amount that becomes in l. and 10-14mg /preferably.

8) For the sodium-selenite concentration in a culture medium, a sodium selenite is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 2-20, and an amount that becomes in l. and 6-10microg /preferably.

9) For the L-glutamine concentration in a culture medium, L-glutamine is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 140-1200, and an amount that becomes in l. and 600mg /preferably.

[0024] 10) The component of the following [ inside / of 200l. of liquids ] (gram unit) : basal-medium component NaCl 1280. 00 KCl 80.00 MgSO4.7H2O 40.00 NaH2PO4andH2O 25.00 CaCl2.2H2O 52.80 Fe(NO3) 3.9H2O 0.02 Phenol Red 3.70 A glucose andH2O 990.00 Pyruvic-acid sodium 22.10 L-alanine 7.14 L-arginine HCl 16.80 L-asparagine andH2O 13.66 L-asparatic acid 10.63 L-cysteine 9.60 L-glutamic acid 11.83 Glycine 6.02 L-histidine HCl-H2O 8.40 L-isoleucine 21.00 L-leucine 21.00 L-lysine HCl 29.20 L-methionine 6.00 L-phenylalanine 13.20 L-proline 9.22 L-serine 8.42 L-threonine 19.00 L-tryptophan 3.20 L-thyrosin 14.40 L-valine 18.80 Calcium pantothenate 0.80 Choline chloride 0.80 Folic acid 0.80 I-inositol 1.44 Nicotinamide 0.80 Pyridoxal HCl 0.80 Riboflavin 0.08 Thiamine HCl0.80 NaHCO3 750.00 additional components Human insulin (Hoechst:PHFM) 2.00 Homo sapiens transferrin (Behringwerke AG) Product identifier: phiTRE 7.00 Ethanolamine 1.68ml \*\* serine acid sodium (1mM) 9.4ml Distilled water 200l. of ad(s) is contained. And it is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which L-glutamine is added before use in an amount from which 140-1200mg /becomes the concentration of 600mg/l. preferably l.

11) Operation of the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication for a hybridoma, transformer FEKUTOMA, or tumor cell network growth.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

EXAMPLE

---

[Example] The culture medium which has the following presentations was prepared. The shown amount (gram unit) is related with 200l. of culture media.

[0014]

Basal-medium component NaCl 1280. 00 KCl 80.00 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 40.00 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>andH<sub>2</sub>O 25.00 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 52.80 Fe(NO<sub>3</sub>) 3.9H<sub>2</sub>O 0.02 Phenol Red 3.70 A glucose andH<sub>2</sub>O 990.00 Pyruvic-acid sodium 22.10 L-alanine 7.14 L-arginine HCl 16.80 L-asparagine andH<sub>2</sub>O 13.66 L-asparatic acid 10.63 L-cysteine 9.60 L-glutamic acid 11.83 Glycine 6.02 L-histidine HCl-H<sub>2</sub>O 8.40 L-isoleucine 21.00 L-leucine 21.00 L-lysine HCl 29.20 L-methionine 6.00 L-phenylalanine 13.20 L-proline 9.22 L-serine 8.42 L-threonine 19.00 L-tryptophan 3.20 L-thyrosin 14.40 L-valine 18.80 Calcium pantothenate 0.80 Choline chloride 0.80 Folic acid 0.80 I-inositol 1.44 Nicotinamide 0.80 Pyridoxal HCl 0.80 Riboflavin 0.08 Thiamine HCl 0.80 NaHCO<sub>3</sub>750.00 additional component Human insulin (Hoechst:PHFM) 2.00 Homo sapiens transferrin (Behringwerke AG, product identifier:phiTRE) 7.00 Ethanolamine 1.68ml Sodium selenite (1mM) 9.4ml Distilled water 200l. [0015] of ad(s) 600mg/l. In order to compare a hybridoma and transformer FEKUTOMA with this culture medium and it, it was made to increase by the FBS content basal medium (Dulbecco culture-medium +FBS) after adding a glutamine. A result is shown in Table 1. Under the standard cell culture condition, the cell was shown to Table 1 in a steamy saturation ambient atmosphere by 37 degrees C and 5%CO<sub>2</sub>, and period culture was carried out and it measured a viable count and product concentration about the aliquot.

[0016] It is proved that these data have a DKHI culture medium equivalent to a D-FBS perfect medium about cell proliferation and productive efficiency. Both the culture media of a proliferation rate are the same.

[0017] Furthermore, Homo sapiens and a rat tumor cell network were also able to be cultivated by the culture medium (Table 2). The culture medium for a comparison was made into the ITES culture medium released by DMEM+10%FBS, Murakami, etc. (Proc.natl.Acad.Sci.USA 79, 1158-1162, 1982).

[0018] A DKHI culture medium is 10mg/l. An insulin and 200micro mol/l. Ethanolamine, 1 mmol/liter It differs from an ITES culture medium at the point which contains a pyruvic acid and 3.75g [/l. ] sodium hydrogencarbonate, and does not contain the HEPES buffer solution (see Table 3 for a comparison). The improvement in cell proliferation is brought about as these differences are shown in Table 2.

[0019]

[Table 1]

細胞系統	細胞数 x 10 <sup>5</sup> /ml xxx					生産効率	
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	(5日目、ngタンパク質/ml)	
トランスフェクターマ							
BHK系	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A	/ B
B 70/6	2/2	2/2	4/4	8/8	8/8	1000-2000/	500-2000 x
B 52/44	3/3	3/3	6/6	10/10	10/10	1000-2500/	1000-2000 x
B 101/8	2/2	2/2	4/4	8/8	8/8	2000-3000/	2500-4000 x
-----							
ハイブリドーマ							
SP-2系							
835/6	2/2	3/3	6/6	12/12	12/12	12000/30000	xx
2128/65	2/2	3/3	6/6	12/12	12/12	10000/	2000 xx
NSO系							
2064/34	2/2	3/3	6/6	10/10	10/10	20000/20000	xx
2093/1072	2/2	3/3	6/6	11/11	11/11	20000/25000	xx

x : ヒト IgG

xx : マウス IgG

xxx : 顕微鏡計数箱で測定

A : D-FBS-培地

B : DKHI-培地

[0020]

[Table 2]

	DKHI	DMEM+10%FBS	ITES
乳癌(ヒト): T-47	増殖	増殖	増殖なし
メラノーマ(ヒト): M-21	増殖	増殖	増殖なし
膵癌(ヒト): PaTu 8902	増殖	増殖	増殖なし
MiaPaCa2	増殖	増殖	増殖なし
結腸癌(ヒト): LOVO	増殖	増殖	増殖なし
LS-174-T	増殖	増殖	増殖なし
胃癌(ヒト): Mz-Sto-1	増殖	増殖	増殖なし
乳腺癌(ラット): Rc3230Ac	増殖	増殖	増殖なし
マクロファージ(ヒト): U-937	増殖	増殖	増殖なし

[0021]

[Table 3]



I T E S 培地およびD K H I 培地における添加成分の比較

	I T E S	D K H I	
基礎培地	DMEM／F12(1 : 1)	DMEM	
HEPES	15mM	—	*
NaHCO <sub>3</sub>	1.2 g／ℓ	3.75 g／ℓ	*
インスリン	5mg／ℓ	10mg／ℓ	*
トランスフェリン	35mg／ℓ	35mg／ℓ	
亜セレン酸ナトリウム	2.5nM-2.5mM	50nM	
エタノールアミン	20μM	200μM	*
ピルビン酸ナトリウム	—	1mM	*
L-グルタミン	—	2mM	*

\* I T E S 培地およびD K H I 培地の間の有意差

[0022] As mentioned above, although this invention was explained to the detail, this invention can summarize and show this according to the following embodiment further.

1) The nutrition culture medium for cell cultures containing the amino acid characterized by containing further Homo sapiens transferrin, human insulin, ethanolamine, and a sodium selenite, a vitamin, cofactor, and the usual mineral salt.

2) The nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication containing the transferrin and the insulin which were approved clinically.

3) The nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication whose use basal medium is DMEM/F12 (1:1) culture medium, DMEM (Dulbecco denaturation Eagle's medium), the William culture medium E, or hum F12 culture medium.

4) The pyruvic-acid sodium concentration in a culture medium is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which a use basal medium is RPMI 1640 culture medium, CMRL 1066 culture medium, a BME basal medium, a way mouse culture medium, NCTC 135 culture medium, or MEM (minimum essential medium), and pyruvic-acid sodium is added in 25-500, and an amount that becomes in l. and 110mg /preferably.

[0023] 5) For the insulin concentration in a culture medium, an insulin is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 6-20, and an amount that becomes in l. and 8-12mg /preferably.

6) For the transferrin concentration in a culture medium, transferrin is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 20-50, and an amount that becomes in l. and 30-40mg /preferably.

7) For the ethanolamine concentration in a culture medium, ethanolamine is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 1.3-20, and an amount that becomes in l. and 10-14mg /preferably.

8) For the sodium-selenite concentration in a culture medium, a sodium selenite is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 2-20, and an amount that becomes in l. and 6-10microg /preferably.

9) For the L-glutamine concentration in a culture medium, L-glutamine is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which it is added in 140-1200, and an amount that becomes in l. and 600mg /preferably.

[0024] 10) The component of the following [ inside / of 200l. of liquids ] (gram unit) : basal-medium component NaCl 1280.00 KCl 80.00 MgSO4.7H2O 40.00 NaH2PO4andH2O 25.00 CaCl2.2H2O 52.80 Fe(NO3) 3.9H2O 0.02 Phenol Red 3.70 A glucose andH2O 990.00 Pyruvic-acid sodium 22.10 L-alanine 7.14 L-arginine HCl 16.80 L-asparagine andH2O 13.66 L-asparatic acid 10.63 L-cysteine 9.60 L-glutamic acid 11.83 Glycine 6.02 L-histidine

HCl-H<sub>2</sub>O 8.40 L-isoleucine 21.00 L-leucine 21.00 L-lysine HCl 29.20 L-methionine 6.00 L-phenylalanine 13.20 L-proline 9.22 L-serine 8.42 L-threonine 19.00 L-tryptophan 3.20 L-tyrosin 14.40 L-valine 18.80 Calcium pantothenate 0.80 Choline chloride 0.80 Folic acid 0.80 I-inositol 1.44 Nicotinamide 0.80 Pyridoxal HCl 0.80 Riboflavin 0.08 Thiamine HCl 0.80 NaHCO<sub>3</sub> 750.00 additional components Human insulin (Hoechst:PHFM) 2.00 Homo sapiens transferrin (Behringwerke AG) Product identifier: phiTRE 7.00 Ethanolamine 1.68ml \*\* serine acid sodium (1mM) 9.4ml Distilled water 200l. of ad(s) is contained. And it is the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication by which L-glutamine is added before use in an amount from which 140-1200mg /becomes the concentration of 600mg/l. preferably l.

11) Operation of the nutrition culture medium of the preceding clause 1 publication for a hybridoma, transformer FEKUTOMA, or tumor cell network growth.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-78759

(43)公開日 平成6年(1994)3月22日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/06		9281-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9281-4B		E

審査請求 未請求 請求項の数5(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-140227

(22)出願日 平成5年(1993)6月11日

(31)優先権主張番号 P 4 2 1 9 2 5 0 : 1

(32)優先日 1992年6月12日

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 390037969

ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼルシ  
ヤフト

BEHRINGWERKE AKTIEN  
GESELLSCHAFT

ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン  
(番地なし)

(72)発明者 クラウス・ボスレット

ドイツ連邦共和国デー-3550マルブルク。  
アンデアハウシュタト64

(74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

(54)【発明の名称】 無血清細胞培養培地

(57)【要約】

【目的】 アミノ酸、ビタミン、補助因子および無機塩を含むが動物タンパク質を含まない細胞増殖用栄養培地に関する。

【構成】 ヒトトランスフェリン、ヒトインスリン、エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウムを更に含有することを特徴とするアミノ酸、ビタミン、補助因子および通常は無機塩を含有する細胞培養用栄養培地。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトトランスフェリン、ヒトインスリン、エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウムを更に含有することを特徴とするアミノ酸、ビタミン、補助因子および通常は無機塩を含有する細胞培養用栄養培地。

【請求項2】 使用基礎培地がDMEM/F12 (1:1) 培地、DMEM (ダルベッコ変性イーグル培地)、ウイリアム培地E、またはハムF12培地である請求項1記載の栄養培地。

【請求項3】 使用基礎培地がRPMI 1640培地、CMRL 1066培地、BME基礎培地、ウエイマウス培地、NCTC 135培地またはMEM (最少必須培地) であり、そしてピルビン酸ナトリウムが培地中のピルビン酸ナトリウム濃度が25~500、好ましくは110mg/リットルとなるような量で添加される請求項1記載の栄養培地。

【請求項4】 液体200リットル中に以下の成分 (グラム単位) :

10

基礎培地成分

NaCl	1280.00
KCl	80.00
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	25.00
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	52.80
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.02
フェノールレッド	3.70
グルコース · H <sub>2</sub> O	990.00
ピルビン酸ナトリウム	22.10
L-アラニン	7.14
L-アルギニンHCl	16.80
L-アスパラギン · H <sub>2</sub> O	13.66
L-アスパラギン酸	10.63
L-システイン	9.60
L-グルタミン酸	11.83
グリシン	6.02
L-ヒスチジンHCl · H <sub>2</sub> O	8.40
L-イソロイシン	21.00
L-ロイシン	21.00
L-リジンHCl	29.20
L-メチオニン	6.00
L-フェニルアラニン	13.20
L-プロリン	9.22
L-セリン	8.42
L-トレオニン	19.00
L-トリプトファン	3.20
L-チロシン	14.40
L-バリン	18.80
パントテン酸カルシウム	0.80
塩化コリン	0.80
葉酸	0.80
I-イノシトール	1.44
ニコチンアミド	0.80
ピリドキサールHCl	0.80
リボフラビン	0.08
チアミンHCl	0.80
NaHCO <sub>3</sub>	750.00

付加的成分

ヒトインスリン (Hoechst: PHFM)	2.00
-------------------------	------

ヒトトランスフェリン (Behringwerke AG,

製品特定記号:  $\phi$  TRE)

エタノールアミン

亜セレン酸ナトリウム (1 mM)

蒸留水

を含有し、そして使用前に L-グルタミンが 140~1200 mg/リットル、好ましくは 600 mg/リットルの濃度となるような量で添加される請求項 1 記載の栄養培地。

【請求項 5】 ハイブリドーマ、トランスフェクトーマまたは腫瘍細胞系統増殖のための請求項 1 記載の栄養培地の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】 本発明は、アミノ酸、ビタミン、補助因子および無機塩を含むが動物タンパク質を含まない細胞増殖用栄養培地に関する。

【0002】 バイオテクノロジーに基づく現代医薬の生産は多くの場合に複雑な真核細胞培養生産システムに依存している。何故ならば単純な原核生物では多くの糖タンパク質を機能的に活性な形で生産し得ないからである。これらの複雑な真核細胞培養系は、規定された塩、ビタミン、補助因子およびアミノ酸 (基礎培地) のほかに高分子量タンパク質または脂質の混合物、特にコスト高の牛胎児血清 (FBS) を含む栄養培地を要求する。栄養培地中多数かつ高濃度に要求されるがあまり明確になっておらず、そして例えば牛胎児血清に起原するこれら高分子量成分は、発酵槽生産段階の後、手のこんだ精製方法により、生産されるべき薬品から分離されねばならない。さらに、使用 FBS が病原物質を含まないことを保証することが必要である。

【0003】 コスト高の FBS 含有栄養培地と丁度同じ位に広範囲にわたる真核細胞系統の増殖を可能とし、かつ動物異タンパク質を含有しない低コスト栄養培地があれば望ましいであろう。

【0004】 驚くべきことに、多数の真核細胞系統の永続的増殖を、FBS 含有栄養培地と同程度に可能にする規定された妥当な価格の栄養培地を生産できることを見出した。それは動物タンパク質を含まないが、アミノ酸、ビタミン、補助因子および通常は無機塩のほかに、ヒトトランスフェリン、ヒトインスリン、エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウムを含有する。

【0005】 本発明はヒトトランスフェリン、ヒトインスリン、エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウムを含有することを特徴とするアミノ酸、ビタミン、補助

#### 基礎培地成分

NaCl	1280.00
KCl	80.00
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	25.00
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	52.80

7.00

1.68 ml

9.4 ml

ad 200 リットル

因子および通常は無機塩を含有する細胞培養用栄養培地に関する。

【0006】 臨床的に認可されているトランスフェリンおよびインスリンを用いるのが好ましい。

【0007】 アミノ酸、ビタミン、補助因子および無機塩を含む培地 (基礎培地) として従来技術において知られた培地を用いることができる。

【0008】 このタイプの基礎培地は例えば MEM アルファ培地、DMEM/F12 (1:1) 培地、DMEM (ダルベッコ変性イーグル培地)、ウイリアム (William) 培地 E、ハム (Ham) F12 培地などである。

【0009】 ピルビン酸ナトリウムを 25~500、好ましくは 110 mg/リットルの濃度で添加すれば他の基礎培地を用いることができる。これらの基礎培地の例は次のとおりである: RPMI 1640 培地、CMRL 1066 培地、BME 基礎培地、ウェイマウス (Waymouth) 培地、NCTC 135 培地、MEM (最小必須培地)。

【0010】 インスリンおよびトランスフェリンはこれら基礎培地のいずれかに、その培地中濃度がインスリンについては 6~20、好ましくは 8~12 mg/リットルそしてトランスフェリンについては 20~50、好ましくは 30~40 mg/リットルに達するように添加される。

【0011】 エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウムは基礎培地に、その培地中濃度がエタノールアミンについては 1.3~20、好ましくは 8~14 mg/リットルそして亜セレン酸ナトリウムについては 2~20、好ましくは 6~10  $\mu$ g/リットルに達するように添加される。

【0012】 L-グルタミンはこのアミノ酸の濃度が 140~1200 mg/リットル、好ましくは 600 mg/リットルとなるように使用前に培地に添加される。

【0013】

【実施例】 以下の組成を有する培地を調製した。示された量 (グラム単位) は培地 200 リットルに関するものである。

【0014】



Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.02
フェノールレッド	3.70
グルコース · H <sub>2</sub> O	990.00
ピルビン酸ナトリウム	22.10
L-アラニン	7.14
L-アルギニンHCl	16.80
L-アスパラギン · H <sub>2</sub> O	13.66
L-アスパラギン酸	10.63
L-システイン	9.60
L-グルタミン酸	11.83
グリシン	6.02
L-ヒスチジンHCl · H <sub>2</sub> O	8.40
L-イソロイシン	21.00
L-ロイシン	21.00
L-リジンHCl	29.20
L-メチオニン	6.00
L-フェニルアラニン	13.20
L-プロリン	9.22
L-セリン	8.42
L-トレオニン	19.00
L-トリプトファン	3.20
L-チロシン	14.40
L-バリン	18.80
パントテン酸カルシウム	0.80
塩化コリン	0.80
葉酸	0.80
I-イノシトール	1.44
ニコチンアミド	0.80
ピリドキサールHCl	0.80
リボフラビン	0.08
チアミンHCl	0.80
NaHCO <sub>3</sub>	750.00

#### 付加的成分

ヒトインスリン (Hoechst: PHFM)	2.00
ヒトトランスフェリン (Behringwerke AG, 製品特定記号: φTRE)	7.00
エタノールアミン	1.68ml
亜セレン酸ナトリウム (1mM)	9.4ml
蒸留水	ad 200リットル

【0015】600mg/リットル グルタミンを添加後、ハイブリドーマおよびトランスフェクトーマをこの培地およびそれと比較するために、FBS含有基礎培地（ダルベッコ培地＋FBS）で増殖させた。結果を表1に示す。細胞は標準的細胞培養条件下、37℃および5%CO<sub>2</sub>で蒸気飽和雰囲気中表1に示された期間培養され、そして生細胞数および生成物濃度をアリコートについて測定した。

【0016】それらデータはDKHI培地が細胞増殖および生産効率に関し、D-FBS完全培地と等価であることを実証している。増殖速度は両培地とも同一であ

る。

【0017】さらに、その培地でヒトおよびラット腫瘍細胞系統を培養することもできた（表2）。比較用培地はDMEM＋10%FBSおよびMurakami等（Proc. natl. Acad. Sci. USA 79, 1158-1162, 1982）により公表されたITES培地とした。

【0018】DKHI培地は、10mg/リットル インスリン、200μmol/リットル エタノールアミン、1mmol/リットル ピルビン酸および3.75g/リットル 炭酸水素ナトリウムを含有しHEPES緩衝液を含有しない点でITES培地と異なる（比較には表3を参

照)。これらの相違が表2に示されるとおり細胞増殖向上をもたらす。

【0019】

【表1】

細胞系統	細胞数 x 10 <sup>5</sup> /ml xxx					生産効率	
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	(5日目、ngタンパク質/ml)	
トランスフェクターマ							
BHK系	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A	/ B
B 70/6	2/2	2/2	4/4	8/8	8/8	1000-2000/	500-2000 x
B 52/44	3/3	3/3	6/6	10/10	10/10	1000-2500/	1000-2000 x
B 101/8	2/2	2/2	4/4	8/8	8/8	2000-3000/	2500-4000 x
ハイブリドーマ							
SP-2系							
835/6	2/2	3/3	6/6	12/12	12/12	12000/30000	xx
2128/65	2/2	3/3	6/6	12/12	12/12	10000/	2000 xx
NSO系							
2064/34	2/2	3/3	6/6	10/10	10/10	20000/20000	xx
2093/1072	2/2	3/3	6/6	11/11	11/11	20000/25000	xx

x: ヒトIgG

xx: マウスIgG

xxx: 顕微鏡計数箱で測定

A: D-FBS-培地

B: DKHI-培地

【0020】

【表2】

	DKHI	DMEM+10%FBS	ITES
乳癌(ヒト): T-47	増殖	増殖	増殖なし
メラノーマ(ヒト): M-21	増殖	増殖	増殖なし
膵癌(ヒト): PaTu 8902	増殖	増殖	増殖なし
MiaPaCa2	増殖	増殖	増殖なし
結腸癌(ヒト): LOVO	増殖	増殖	増殖なし
LS-174-T	増殖	増殖	増殖なし
胃癌(ヒト): Mz-Sto-1	増殖	増殖	増殖なし
乳腺癌(ラット): Rc3230Ac	増殖	増殖	増殖なし
マクロファージ(ヒト): U-937	増殖	増殖	増殖なし

【0021】

【表3】

## I T E S 培地およびDKH I 培地における添加成分の比較

	I T E S	DKH I	
基礎培地	DMEM/F12(1:1)	DMEM	
HEPES	15mM	—	*
NaHCO <sub>3</sub>	1.2g/ℓ	3.75g/ℓ	*
インスリン	5mg/ℓ	10mg/ℓ	*
トランスフェリン	35mg/ℓ	35mg/ℓ	
亜セレン酸ナトリウム	2.5nM-2.5mM	50nM	
エタノールアミン	20μM	200μM	*
ピルビン酸ナトリウム	—	1mM	*
L-グルタミン	—	2mM	*

## \* I T E S 培地およびDKH I 培地の間の有意差

【0022】以上、本発明を詳細に説明したが、本発明はさらに次の実施態様によってこれを要約して示すことができる。

1) ヒトトランスフェリン、ヒトインスリン、エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウムを更に含有することを特徴とするアミノ酸、ビタミン、補助因子および通常は無機塩を含有する細胞培養用栄養培地。

2) 臨床的に認可されたトランスフェリンおよびインスリンを含有する前項1記載の栄養培地。

3) 使用基礎培地がDMEM/F12(1:1)培地、DMEM(ダルベッコ変性イーグル培地)、ウイリアム培地E、またはハムF12培地である前項1記載の

4) 使用基礎培地がRPMI 1640培地、CMRL 1066培地、BME基礎培地、ウエイマウス培地、NCTC 135培地またはMEM(最小必須培地)であり、そしてピルビン酸ナトリウムが培地中のピルビン酸ナトリウム濃度が2.5~500、好ましくは110mg/リットルとなるような量で添加される前項1記

## 基礎培地成分

NaCl	1280.00
KCl	80.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	25.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	52.80
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.02
フェノールレッド	3.70
グルコース·H <sub>2</sub> O	990.00
ピルビン酸ナトリウム	22.10
L-アラニン	7.14
L-アルギニンHCl	16.80
L-アスパラギン·H <sub>2</sub> O	13.66

載の栄養培地。

【0023】5) インスリンが培地中のインスリン濃度が6~20、好ましくは8~12mg/リットルとなるような量で添加される前項1記載の栄養培地。

6) トランスフェリンが培地中のトランスフェリン濃度が20~50、好ましくは30~40mg/リットルとなるような量で添加される前項1記載の栄養培地。

7) エタノールアミンが培地中のエタノールアミン濃度が1.3~20、好ましくは10~14mg/リットルとなるような量で添加される前項1記載の栄養培地。

8) 亜セレン酸ナトリウムが培地中の亜セレン酸ナトリウム濃度が2~20、好ましくは6~10μg/リットルとなるような量で添加される前項1記載の栄養培地。

9) L-グルタミンが培地中のL-グルタミン濃度が140~1200、好ましくは600mg/リットルとなるような量で添加される前項1記載の栄養培地。

【0024】10) 液体200リットル中に以下の成分(グラム単位)：

L-アスパラギン酸	10.63
L-システイン	9.60
L-グルタミン酸	11.83
グリシン	6.02
L-ヒスチジンHCl・H <sub>2</sub> O	8.40
L-イソロイシン	21.00
L-ロイシン	21.00
L-リジンHCl	29.20
L-メチオニン	6.00
L-フェニルアラニン	13.20
L-プロリン	9.22
L-セリン	8.42
L-トレオニン	19.00
L-トリプトファン	3.20
L-チロシン	14.40
L-バリン	18.80
パントテン酸カルシウム	0.80
塩化コリン	0.80
葉酸	0.80
L-イノシトール	1.44
ニコチンアミド	0.80
ピリドキサールHCl	0.80
リボフラビン	0.08
チアミンHCl	0.80
NaHCO <sub>3</sub>	750.00

#### 付加的成分

ヒトインスリン (Hoechst: PHFM)	2.00
ヒトトランスフェリン (Behringwerke AG, 製品特定記号: φTRE)	7.00
エタノールアミン	1.68ml
亜セリン酸ナトリウム (1mM)	9.4ml
蒸留水	ad 200リットル

を含有し、そして使用前にL-グルタミンが140～1200mg/リットル、好ましくは600mg/リットルの濃度となるような量で添加される前項1記載の栄養培地。

11) ハイブリドーマ、トランスフェクトーマまたは腫瘍細胞系統増殖のための前項1記載の栄養培地の使用方法。